

BUNDESREPUBLIK DEUTSCHLAND



Prioritätsbescheinigung über die Einreichung einer Patentanmeldung

Aktenzeichen: 102 32 930.3
Anmeldetag: 19. Juli 2002
Anmelder/Inhaber: Consortium für elektrochemische Industrie GmbH, München/DE
Bezeichnung: Verfahren zur fermentativen Herstellung von Aminosäuren und Aminosäure-Derivaten der Phosphoglycerat-Familie
IPC: C 12 N, C 12 P

Die angehefteten Stücke sind eine richtige und genaue Wiedergabe der ursprünglichen Unterlagen dieser Patentanmeldung.

München, den 08. Mai 2003
Deutsches Patent- und Markenamt
Der Präsident
Im Auftrag

A handwritten signature in black ink, appearing to read 'Dzierzon', is placed over a horizontal line.

Dzierzon

Verfahren zur fermentativen Herstellung von Aminosäuren und Aminosäure-Derivaten der Phosphoglycerat-Familie

Die Erfindung betrifft ein Verfahren zur Herstellung von Aminosäuren und Aminosäure-Derivaten der Phosphoglycerat-Familie wie beispielsweise O-Acetyl-L-Serin, N-Acetyl-L-Serin, L-Cystein, LL-Cystin und L-Cystein-Derivaten mittels Fermentation.

Die Herstellung der zwanzig natürlichen, proteinogenen Aminosäuren wird heutzutage vorwiegend durch Fermentation von Mikroorganismen bewerkstelligt. Dabei wird ausgenutzt, dass Mikroorganismen über entsprechende Biosynthesewege zur Synthese der natürlichen Aminosäuren verfügen.

Solche Biosynthesewege unterliegen jedoch in Wildtyp-Stämmen einer strengen Kontrolle, die gewährleistet, dass die Aminosäuren nur zum Eigenbedarf der Zelle hergestellt werden. Eine wichtige Voraussetzung für effiziente Produktionsprozesse ist es deshalb, dass geeignete Mikroorganismen verfügbar sind, die im Gegensatz zu Wildtyp-Organismen eine drastisch gesteigerte Produktionsleistung für die Herstellung der gewünschten Aminosäure aufweisen.

Solche Aminosäure-überproduzierende Mikroorganismen können durch klassische Mutations-/Selektionsverfahren und/oder durch moderne, gezielte, rekombinante Techniken („metabolic engineering“) erzeugt werden. Bei letzterem werden zunächst Gene oder Allele identifiziert, die durch ihre Veränderung, Aktivierung oder Inaktivierung eine Überproduktion bewirken. Diese Gene/Allele werden dann durch molekularbiologische Techniken in einen Mikroorganismenstamm eingebracht oder inaktiviert, so dass eine optimale Überproduktion erzielt wird. Häufig führt jedoch erst die Kombination mehrerer, verschiedener Maßnahmen zu einer wirklich effizienten Produktion.

Die Phosphoglycerat-Familie von Aminosäuren ist dadurch definiert, dass es sich um Aminosäuren handelt, die in ihrer Bio-

Beglaubigte Kopie

BUDAPEST TREATY ON THE INTERNATIONAL
RECOGNITION OF THE DEPOSIT OF MICROORGANISMS
FOR THE PURPOSES OF PATENT PROCEDURE

DUPLIKAT

INTERNATIONAL FORM

Consortium für elektrochem.
Industrie GmbH
Zielstattstr. 20
81379 München

DSMZ-Deutsche Sammlung von Mikroorganismen
und Zellkulturen GmbH
U. Weis 04.08

VIABILITY STATEMENT

issued pursuant to Rule 10.2 by the
INTERNATIONAL DEPOSITORY AUTHORITY
identified at the bottom of this page

I. DEPOSITOR	II. IDENTIFICATION OF THE MICROORGANISM
Name: Consortium für elektrochem. Industrie GmbH Address: Zielstattstr. 20 81379 München	Accession number given by the INTERNATIONAL DEPOSITORY AUTHORITY: DSM 10172 Date of the deposit or the transfer: 1995-08-18
III. VIABILITY STATEMENT	
The viability of the microorganism identified under II above was tested on 1995-08-21. On that date, the said microorganism was <input checked="" type="checkbox"/> ³ viable <input type="checkbox"/> ³ no longer viable	
IV. CONDITIONS UNDER WHICH THE VIABILITY TEST HAS BEEN PERFORMED ⁴	
V. INTERNATIONAL DEPOSITORY AUTHORITY	
Name: DSM-DEUTSCHE SAMMLUNG VON MIKROORGANISMEN UND ZELLKULTUREN GmbH Address: Mascheroder Weg 1b D-38124 Braunschweig	Signature(s) of person(s) having the power to represent the International Depository Authority or of authorized official(s):  Date: 1995-08-23

¹ Indicate the date of original deposit or, where a new deposit or a transfer has been made, the most recent relevant date (date of the new deposit or date of the transfer).

² In the cases referred to in Rule 10.2(a) (ii) and (iii), refer to the most recent viability test.

³ Mark with a cross the applicable box.

⁴ Fill in if the information has been requested and if the results of the test were negative.

synthese von der 3-Phosphoglycerinsäure abgeleitet werden. Der natürliche Pfad des Stoffwechsels führt dabei zunächst über die Zwischenstufen 3-Phosphohydroxypyruvat und 3-Phospho-L-serin zu L-Serin. L-Serin kann weiterhin zu Glycin bzw. über 5 O-Acetyl-L-Serin zu L-Cystein umgesetzt werden.

Für die fermentative Herstellung von Aminosäuren der Phosphoglycerat-Familie, insbesondere von L-Serin und L-Cystein, sind bereits einige Gene/Allele im Stand der Technik 10 bekannt, deren Einsatz zu einer Aminosäure-Überproduktion führen:

- serA-Allele wie beschrieben in EP0620853B1 oder EP0931833A2.
- 15 Diese serA-Allele kodieren für 3-Phosphoglycerat-Dehydrogenasen, die einer verminderten Feedback-Hemmung durch L-Serin unterliegen. Dadurch wird die Bildung von 3-Hydroxypyruvat weitgehend vom Serin-Spiegel der Zelle entkoppelt.
- 20 - cysE-Allele wie beschrieben in
 - WO 97/15673 (hereby incorporated by reference) oder
 - Nakamori S. et al., 1998, Appl. Env. Microbiol. 64: 1607-1611 (hereby incorporated by reference) oder
 - Takagi H. et al., 1999, FEBS Lett. 452: 323-327 beschrieben, in einen Mikroorganismenstamm eingebracht werden.Diese cysE-Allele kodieren für Serin-O-Acetyl-Transferasen, die einer verminderten Feedback-Hemmung durch L-Cystein unterliegen. Dadurch wird die Bildung von O-Acetyl-L-Serin 30 bzw. L-Cystein weitgehend vom Cystein-Spiegel der Zelle entkoppelt.
- Efflux-Gene wie beschrieben in EP0885962A1 Das beschriebene orf-Gen kodiert wahrscheinlich für ein Efflux-System, das zur Ausschleusung von Anitbiotika und anderern toxischen Stoffen geeignet ist und die Überproduktion von L-Cystein, L-Cystin, N-Acetyl-Serin und/oder Thiazolidinderivaten bewirkt.

- cysB-Gen wie beschrieben in DE19949579C1
Das cysB-Gen kodiert für einen zentralen Genregulator des Schwefelstoffwechsel und spielt somit eine entscheidende Rolle bei der Bereitstellung von Sulfid für die Cystein-Biosynthese.

Aus dem Stand der Technik ist ebenfalls bekannt, dass die angegebenen Verfahren auch zu Cystein-Derivaten führen können.

10 So kann LL-Cystin als Oxidationsprodukt von L-Cystein oder 2-Methyl-thiazolidin-2,4-dicarbonsäure als Kondensationsprodukt von L-Cystein und Pyruvat während der Fermentation entstehen. Da L-Cystein der zentrale Schwefel-Donor der Zelle ist, können die beschriebenen Verfahren auch als Ausgangspunkt zur Herstellung verschiedenster schwefelhaltiger Metaboliten (z.B. L-Methionin, (+)-Biotin, Thiamin etc.) benutzt werden, die im Sinne der vorliegenden Erfindung als L-Cystein-Derivate aufzufassen sind.

20 Außerdem wurde beschrieben, dass bei geeigneter Vorgehensweise auch die Aminosäuren N-Acetyl-L-Serin (EP-A1-0885962) bzw. O-Acetyl-L-Serin (DE-A-10107002) als Hauptfermentationsprodukte gebildet werden können. L-Serin kann wiederum gemäß DE-A-10219851 relativ einfach aus N-Acetyl-L-Serin-haltigen Fermen-
tationsbrühen gewonnen werden.

Aufgabe der vorliegenden Erfindung ist es, einen rekombinanten Mikroorganismenstamm zur Verfügung zu stellen, der eine Überproduktion von Aminosäuren oder Aminosäure-Derivaten der Phosphoglycerat-Familie ermöglicht. Eine weitere Aufgabe ist es, ein fermentatives Verfahren für die Herstellung von Aminosäuren oder Aminosäure-Derivaten der Phosphoglycerat-Familie mittels des rekombinanten Mikroorganismenstammes zur Verfügung zu stellen.

35 Die erstgenannte Aufgabe wird gelöst durch einen Mikroorganismenstamm, der zur fermentativen Herstellung von Aminosäuren der Phosphoglycerat-Familie oder deren Derivaten geeignet ist,

herstellbar aus einem Ausgangsstamm, dadurch gekennzeichnet, daß er eine gegenüber dem Ausgangsstamm erhöhte Aktivität des yfiK-Genprodukts oder eines Genprodukts eines yfiK-Homologs aufweist.

5

Eine Erhöhung der Aktivität des yfiK-Genprodukts ist im Sinne der vorliegenden Erfindung auch dann gegeben, wenn durch eine Erhöhung der Genproduktmenge in der Zelle eine erhöhte Gesamtaktivität in der Zelle erreicht wird und somit die spezifische 10 Aktivität des Genprodukts zwar unverändert bleibt, aber die Aktivität des yfiK-Genprodukts pro Zelle erhöht ist.

Das yfiK-Gen von *Escherichia coli* wurde im Rahmen der Genomsequenzierung (Blattner et al. 1997, *Science* 277:1453-1462) als 15 offener Leserahmen identifiziert und kodiert für ein Protein mit 195 Aminosäuren. Bisher konnte dem yfiK-Gen keine physiologische Funktion zugeordnet werden. Auch eine Datenbankrecherche nach Proteinen mit Sequenzhomologie (FASTA-Algorithmus von GCG Wisconsin Package, Genetics Computer Group (GLG) Madison, Wisconsin) liefert wenig Aufschluß, da lediglich Ähnlichkeiten zu Proteinen angezeigt werden, deren Funktion ebenfalls unbekannt ist. Der einzige Anhaltspunkt für eine mögliche Aktivität des yfiK-Genproduktes ist bei Aleshin et al. (Trends in Biol. Sci., 1999, 24: 133-135) zu finden. Darin wird ein 20 Strukturmotiv postuliert, das eine Proteinfamilie von Aminosäure-Efflux-Proteinen charakterisieren soll. Da dieses schwache Consensus-Motiv auch im YfiK-Protein vorkommt, könnte das YfiK-Protein ein Efflux-System für Aminosäuren darstellen. Es ist jedoch für den Fachmann absolut unmöglich, daraus Schlüsse 25 auf konkrete Aminosäuresubstrate des YfiK-Protein zu ziehen. Der Befund, dass das YfiK-Genprodukt bei der Produktion von Aminosäuren der Phosphoglycerat-Familie einen positiven Beitrag leistet, ist insbesondere deshalb überraschend, da mit dem Y-deD-Genprodukt bereits ein Efflux-Protein für Aminosäuren der 30 Phosphoglyceratfamilie in *Escherichia coli* charakterisiert wurde (Daßler et al. *Mol. Microbiol.*, 2000, 36: 1101-1112) und die Existenz eines zweiten Systems völlig unerwartet ist. In-

teressanterweise bestehen keine Strukturähnlichkeiten zwischen den yfiK- und ydeD-Genprodukten.

Das yfiK-Gen und das YfiK-Genprodukt (YfiK-Protein) sind durch die Sequenzen SEQ ID No. 1 beziehungsweise SEQ ID No. 2 charakterisiert. Im Rahmen der vorliegenden Erfindung sind als yfiK-Homologe solche Gene aufzufassen, die bei einer Analyse mit dem Algorithmus BESTFIT (GCG Wisconsin Package, Genetics Computer Group (GLG) Madison, Wisconsin) eine Sequenzidentität von größer 30 % aufweisen. Besonders bevorzugt ist eine Sequenzidentität von größer 70 %.

Ebenso sind Proteine mit einer Sequenzidentität von größer 30 % (Algorithmus BESTFIT (GCG Wisconsin Package, Genetics Computer Group (GLG) Madison, Wisconsin) als YfiK-homologe Proteine aufzufassen. Besonders bevorzugt ist eine Sequenzidentität von größer 70 %.

Somit sind als yfiK-Homologe auch Allelvarianten des yfiK-Gens zu verstehen, insbesondere funktionelle Varianten, die sich durch Deletion, Insertion oder Substitution von Nukleotiden aus der in SEQ ID No. 1 dargestellten Sequenz ableiten, wobei die enzymatische Aktivität des jeweiligen Genprodukts jedoch erhalten bleibt.

Erfindungsgemäße Mikroorganismen, die eine gegenüber dem Ausgangsstamm erhöhte Aktivität des yfiK-Genprodukts aufweisen, können mit Standardtechniken der Molekularbiologie erzeugt werden.

Als Ausgangsstämme sind prinzipiell alle Organismen geeignet, die den Biosyntheseweg für Aminosäuren der Phosphoglycerat-Familie aufweisen, rekombinanten Verfahren zugänglich sind und durch Fermentation kultivierbar sind. Solche Mikroorganismen können Pilze, Hefen oder Bakterien sein. Bevorzugt handelt es sich um Bakterien der phylogenetischen Gruppe der Eubacteria. Besonders bevorzugt um Mikroorganismen der Familie Enterobacteriaceae und insbesondere der Art *Escherichia coli*.

Die Erhöhung der Aktivität des yfiK-Genprodukts im erfindungsgemäßen Mikroorganismus wird beispielsweise durch eine verstärkte Expression des yfiK-Gens erreicht. Dabei kann die Kopienzahl des yfiK-Gens in einem Mikroorganismus erhöht sein und/oder es kann durch geeignete Promotoren die Expression des yfiK-Gens gesteigerte sein. Unter verstärkter Expression ist dabei vorzugsweise zu verstehen, daß das yfiK-Gen mindestens doppelt so stark exprimiert wird, wie im Ausgangsstamm.

10

Die Erhöhung der Kopienzahl des yfiK-Gens in einem Mikroorganismus kann mit dem Fachmann bekannten Methoden vorgenommen werden. So kann zum Beispiel das yfiK-Gen in Plasmid-Vektoren mit mehrfacher Kopienzahl pro Zelle (z.B. pUC19, pBR322, pACYC184 für *Escherichia coli*) kloniert und in den Mikroorganismus eingebracht werden. Alternativ kann das yfiK-Gen mehrfach ins Chromosom eines Mikroorganismus integriert werden. Als Integrationsverfahren können die bekannten Systeme mit temperenten Bakteriophagen, integrative Plasmide oder die Integration über homologe Rekombination genutzt werden (z.B. Hamilton et al., 1989, *J. Bacteriol.* 171: 4617-4622).

15

20

30

Bevorzugt ist die Erhöhung der Kopienzahl durch Klonierung eines yfiK-Gens in Plasmid-Vektoren unter der Kontrolle eines Promotors. Besonders bevorzugt ist die Erhöhung der Kopienzahl in *Escherichia coli* durch Klonierung eines yfiK-Gens in einem pACYC-Derivat wie z. B. pACYC184-LH (hinterlegt gemäß Budapest-Vertrag bei der Deutschen Sammlung für Mikroorganismen und Zellkulturen, Braunschweig am 18.8.95 unter der Nummer DSM 10172).

Als Kontrollregion für die Expression eines plasmid-kodierten yfiK-Gens kann die natürliche Promotor- und Operatorregion des Gens dienen.

35

Die verstärkte Expression eines yfiK-Gens kann jedoch insbesondere auch mittels anderer Promotoren erfolgen. Entsprechende Promotorsysteme wie beispielsweise in *Escherichia coli* der

konstitutive GAPDH-Promotor des gapA-Gens oder die induzierbaren lac-, tac-, trc-, lambda-, ara oder tet-Promotoren sind dem Fachmann bekannt (Makrides S. C., 1996, Microbiol. Rev. 60: 512-538). Solche Konstrukte können in an sich bekannter 5 Weise auf Plasmiden oder chromosomal verwendet werden.

Des weiteren kann eine verstärkte Expression dadurch erreicht werden, daß Translationsstartsignale, wie z. B. die Ribosomenbindestelle oder das Startcodon des Gens, in optimierter Sequenz 10 auf dem jeweiligen Konstrukt vorhanden sind oder daß gemäß der „codon usage“ seltene Kodons gegen häufiger vorkommende Kodons ausgetauscht werden.

15 Mikroorganismenstämme mit den genannten Modifikationen sind bevorzugte Ausführungen der Erfindung.

Die Klonierung eines yfiK-Gens in Plasmid-Vektoren erfolgt beispielsweise durch spezifische Amplifikation mittels der Polymerase-Ketten-Reaktion unter Einsatz von spezifischen Primern, die das komplette yfiK-Gen erfassen, und anschließende 20 Ligation mit Vektor-DNS-Fragmenten.

Als bevorzugte Vektoren für die Klonierung eines yfiK-Gens werden Plasmide verwendet, die bereits Promotoren zur verstärkten Expression enthalten, beispielsweise den konstitutiven GAPDH-Promotor des gapA-Gens von Escherichia coli.

30 Die Erfindung betrifft somit auch ein Plasmid, das dadurch gekennzeichnet ist, dass es ein yfiK-Gen mit einem Promotor enthält.

Des weiteren sind Vektoren besonders bevorzugt die bereits ein Gen/Allel enthalten, dessen Einsatz zu einer Überproduktion von Aminosäuren der Phosphoglycerat-Familie führt, wie beispielsweise das cysEX-Gen (WO97/15673). Solche Vektoren ermöglichen die direkte Herstellung von erfindungsgemäßen Mikroorganismenstämmen mit hoher Aminosäure-Überproduktion aus einem beliebigen Mikroorganismenstamm, da ein solches Plasmid auch 35

eine Verminderung der Feedback-Hemmung des Cysteinstoffwechsels in einem Mikroorganismus bewirkt.

Die Erfindung betrifft somit auch ein Plasmid, das dadurch gekennzeichnet ist, daß es ein genetisches Element zur Deregulierung des Cysteinstoffwechsels sowie ein yfiK-Gen mit einem Promotor enthält.

Durch eine gängige Transformationsmethode (z.B. Elektroporation) werden die yfiK-haltigen Plasmide in Mikroorganismen eingebracht und beispielsweise mittels Antibiotika-Resistenz auf plasmid-tragende Klone selektiert.

Die Erfindung betrifft somit auch Verfahren zur Herstellung eines erfindungsgemäßen Mikroorganismenstammes, dadurch gekennzeichnet, daß in einen Ausgangsstamm ein erfindungsgemäßes Plasmid eingebracht wird.

Die Produktion von Aminosäuren der Phosphoglycerat-Familie mit Hilfe eines erfindungsgemäßen Mikroorganismenstammes erfolgt in einem Fermenter nach an und für sich bekannten Verfahren.

Die Erfindung betrifft somit auch ein Verfahren zur Herstellung von Aminosäuren der Phosphoglycerat-Familie, welches dadurch gekennzeichnet ist, dass ein erfindungsgemäßer Mikroorganismenstamm in einer Fermentation eingesetzt wird und die produzierte Aminosäure aus dem Fermentationsansatz abgetrennt wird.

Die Anzucht des Mikroorganismenstammes im Fermenter erfolgt als kontinuierliche Kultur, als batch-Kultur oder vorzugsweise als fed-batch-Kultur. Besonders bevorzugt wird eine C-Quelle während der Fermentation kontinuierlich zudosiert.

Als C-Quelle dienen vorzugsweise Zucker, Zuckeralkohole oder organische Säuren. Besonders bevorzugt werden im erfindungsgemäßen Verfahren als C-Quellen Glukose, Laktose oder Glycerin eingesetzt.

Bevorzugt ist die Dosierung der C-Quelle in einer Form, die gewährleistet, dass der Gehalt an C-Quelle im Fermenter während der Fermentation in einem Bereich von 0,1 - 50 g/l gehalten wird. Besonders bevorzugt ist ein Bereich von 0,5 - 10 g/l.

Als N-Quelle werden im erfindungsgemäßen Verfahren vorzugsweise Ammoniak, Ammoniumsalze oder Proteinhydrolysate verwendet. Bei Verwendung von Ammoniak als Korrekturmittel zur pH-Statisierung wird während der Fermentation regelmäßig diese N-Quelle nachdosiert.

Als weitere Medienzusätze können Salze der Elemente Phosphor, Chlor, Natrium, Magnesium, Stickstoff, Kalium, Calcium, Eisen und in Spuren (d.h. in μ M Konzentrationen) Salze der Elemente Molybdän, Bor, Kobalt, Mangan, Zink und Nickel zugesetzt werden.

Des weiteren können organische Säuren (z.B. Acetat, Citrat), Aminosäuren (z.B. Isoleucin) und Vitamine (z.B. B1, B6) dem Medium zugesetzt werden.

Als komplexe Nährstoffquellen können z.B. Hefeextrakt, Maisquellwasser, Sojamehl oder Malzextrakt zum Einsatz kommen.

Die Inkubationstemperatur für mesophile Mikroorganismen beträgt vorzugsweise 15 - 45 °C, besonders bevorzugt 30 - 37 °C.

Die Fermentation wird vorzugsweise unter aeroben Wachstumsbedingungen durchgeführt. Der Sauerstoffeintrag in den Fermenter erfolgt mit Pressluft oder mit reinem Sauerstoff.

Der pH-Wert des Fermentationsmediums liegt während der Fermentation bevorzugt im pH-Bereich von 5,0 bis 8,5, besonders bevorzugt ist ein pH-Wert von 7,0. Ist die erfindungsgemäße Herstellung von O-Acetyl-L-Serin gewünscht, liegt der besonders bevorzugte pH-Bereich zwischen 5,5 und 6,5.

5 Für die Herstellung von L-Cystein und L-Cystein-Derivaten muß während der Fermentation eine Schwefelquelle zugefüttert werden. Bevorzugt kommen dabei Sulfate oder Thiosulfate zum Einsatz.

10 Mikroorganismen, die nach dem beschriebenen Verfahren fermentiert werden, sezernieren in einem Batch- oder Fedbatch-Prozess nach einer Anwachsphase in einem Zeitraum von 10 bis 150 Stunden Aminosäuren der Phospoglycerat-Familie in hoher Effizienz in das Kulturmedium.

15 Die folgenden Beispiele dienen der weiteren Erläuterung der Erfindung.

15 Beispiel 1: Klonierung des yfiK-Gens

Das yfiK-Gen aus Escherichia coli Stamm W3110 wurde mit Hilfe der Polymerase-Ketten-Reaktion amplifiziert. Als spezifische 20 Primer dienten die Oligonukleotide

yfiK-fw: (SEQ. ID. NO: 3)

5'-GGA ATT CAT TAA TGA TCC ATA ACC CCA AAC CTA TC-3'

und

yfiK-rev: (SEQ. ID. NO: 4)

5'-GCC TTA ATT AAG TAG CAA GTT ACT AAG CGG AAG-3'

Das resultierende DNS-Fragment wurde mit den Restriktionszymen AsnI und PacI verdaut, mit Hilfe einer Agarose-Gelelektrophorese gereinigt und isoliert (Qiaquick Gel Extraction Kit, Qiagen, Hilden, D). Die Klonierung erfolgte durch 30 Ligation mit einem NdeI/PacI-geschnittenen Vektor pACYC184-cysEX-GAPDH, der in EP0885962A1 eingehend beschrieben wurde.

Dieser Vektor enthält ein cysEX-Gen, das für eine Serinacetyl-transferase mit verminderter Feedback-Hemmung durch L-Cystein kodiert, und 3'-seitig davon den konstitutiven GAPDH-Promoter 35 des gapA-Gens. Durch das angegebene Vorgehen wird das yfiK-Gen so hinter dem GAPDH-Promotor plaziert, dass die Transkription von dort aus initiiert werden kann. Der resultierende Vektor trägt die Bezeichnung pG13 und ist in Abbildung 1 als Über-

sichtszeichnung gezeigt. Nach der Verifizierung des Konstrukts wurde der Escherichia coli Stamm W3110 transformiert und entsprechende Transformanten mit Tetracyclin selektiert. Der Bakterienstamm Escherichia coli W3110 / pG13 wurde bei der DSMZ (Deutsche Sammlung für Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH, D-38142 Braunschweig) unter der Nummer DSM 15095 gemäß Budapester Vertrag hinterlegt und in folgenden Beispielen als Produktionstamm zur Herstellung von Aminosäuren der Phosphoglycerat-Familie genutzt. Als Vergleichsstamm zur Demonstration des Effektes der erhöhten Expression des yfiK-Gens wurde W3110 / pACYC184-cysEX gewählt, der ebenfalls in EP0885962A1 eingehend beschrieben ist, aber im Unterschied zu pG13 keine GAPDH-Promotor-yfiK-Sequenz enthält.

15 Beispiel 2: Vorkultur des Produktionsstammes

Als Vorkultur für die Fermentation wurden 20 ml LB-Medium (10 g/l Trypton, 5 g/l Hefeextrakt, 10 g/l NaCl), das zusätzlich 15 mg/l Tetracyclin enthielt, mit dem Stamm W3110 / pG13 bzw. W3110 / pACYC184-cysEX beimpft und bei 30 °C und 150 rpm in einem Schüttler inkubiert. Nach sieben Stunden wurde der gesamte Ansatz in 100 ml SM1-Medium (12 g/l K₂HPO₄; 3 g/l KH₂PO₄; 5 g/l (NH₄)₂SO₄; 0,3 g/l MgSO₄ x 7 H₂O; 0,015 g/l CaCl₂ x 2 H₂O; 0,002 g/l FeSO₄ x 7 H₂O; 1 g/l Na₃Citrat x 2 H₂O; 0,1 g/l NaCl; 1 ml/l Spurenelementlösung bestehend aus 0,15 g/l Na₂MoO₄ x 2 H₂O; 2,5 g/l Na₃BO₃; 0,7 g/l CoCl₂ x 6 H₂O; 0,25 g/l CuSO₄ x 5 H₂O; 1,6 g/l MnCl₂ x 4 H₂O; 0,3 g/l ZnSO₄ x 7 H₂O), das mit 5 g/l Glukose; 0,5 mg/l Vitamin B₁ und 15 mg/l Tetracyclin supplementiert wurde, überführt. Die weitere Inkubation erfolgte bei 30 °C für 17 Stunden bei 150 rpm.

Beispiel 3: Fermentative Herstellung von O-Acetyl-L-Serin

Als Fermenter diente ein Biostat M-Gerät der Firma Braun Biotech (Melsungen, D) mit einem maximalen Kulturvolumen von 2 l. Mit der in Beispiel 2 beschriebenen Vorkultur (optische Dichte bei 600 nm von ca. 3) wurde der Fermenter mit 900 ml SM1-Medium, das mit 15 g/l Glukose, 0,1 g/l Trypton, 0,05 g/l He-

feextrakt, 0,5 mg/l Vitamin B₁ und 15 mg/l Tetracyclin supple-
 mentiert wurde, beimpft. Während der Fermentation wurde eine
 Temperatur von 32 °C eingestellt und der pH-Wert durch Zudo-
 sierung von 25 % Ammoniak bei einem Wert von 6,0 konstant
 gehalten. Die Kultur wurde mit entkeimter Druckluft bei 1,5
 vol/vol/min begast und mit einer Rührerdrehzahl von 200 rpm
 gerührt. Nach Absinken der Sauerstoffsättigung auf einen Wert
 von 50 % wurde die Drehzahl über ein Kontrollgerät bis zu ei-
 nem Wert von 1200 rpm erhöht, um 50 % Sauerstoffsättigung zu
 erhalten (Bestimmt mit einer pO₂-Sonde, kalibriert auf 100%
 Sättigung bei 900 rpm). Sobald der Glukose-Gehalt im Fermenter
 von anfänglich 15 g/l auf ca. 5-10 g/l abgesunken war, erfolgte
 eine Zudosierung einer 56 % Glukose-Lösung. Die Fütterung
 erfolgte mit einer Flußrate von 6-12 ml/h, wobei die Glukose-
 konzentration im Fermenter zwischen 0,5 - 10 g/l konstant
 gehalten wurde. Die Glukose-Bestimmung wurde mit dem Glukose-
 analysator der Firma YSI (Yellow Springs, Ohio, USA) durchge-
 führt. Die Fermentationsdauer betrug 28 Stunden. Nach dieser
 Zeit wurden Proben entnommen und die Zellen durch Zentrifuga-
 tion vom Kulturmedium abgetrennt. Die resultierenden Kultur-
 überstände wurden durch reversed phase HPLC an einer LUNA 5 μ
 C18(2)-Säule (Phenomenex, Aschaffenburg, Deutschland) bei ei-
 ner Flußrate von 0,5 ml/min analysiert. Als Eluent diente ver-
 dünnte Phosphorsäure (0,1 ml konz. Phosphorsäure / l). Die Ta-
 belle 1 zeigt die erzielten Gehalte der Hauptstoffwechsel-
 produkte im Kulturüberstand. Diese sind O-Acetyl-L-Serin und
 N-Acetyl-L-Serin, das bei neutralen bis alkalischen Bedingun-
 gen zunehmend durch Isomerisierung aus O-Acetyl-L-Serin ent-
 steht.

30

Tabelle 1:

Stamm	Aminosäure-Gehalt [g/l]	
	O-Acetyl-L-Serin	N-Acetyl-L-Serin
W3110/pACYC184-cysEX	1,8	1,5
W3110/pG13 (cysEX-yfiK)	7,4	3,0

Beispiel 4: Fermentative Herstellung von N-Acetyl-L-Serin

5 Für die Herstellung von N-Acetyl-L-Serin wurde genauso wie in Beispiel 2 und 3 verfahren. Lediglich der pH-Wert in der Fermentation wurde auf den Wert 7,0 eingestellt. Dadurch wird die Isomerisierung von O-Acetyl-L-Serin zu N-Acetyl-L-Serin begünstigt und als Hauptprodukt N-Acetyl-L-Serin erhalten. Die 10 Fermentationszeit betrug 48 Stunden.

Tabelle 2:

Stamm	Aminosäure-Gehalt [g/l]
N-Acetyl-L-Serin	
W3110/pACYC184-cysEX	5,8
W3110/pG13 (cysEX-yfiK)	9,2

15

Beispiel 5: Fermentative Herstellung von L-Cystein und L-Cystein-Derivaten

20 Für die Herstellung von L-Cystein wurde genauso wie in Beispiel 2 und 3 verfahren. Lediglich der pH-Wert in der Fermentation wurde auf den Wert 7,0 eingestellt und eine Zufütterung von Thiosulfat vorgenommen. Dabei wurde nach zwei Stunden eine Zudosierung einer 30 % Na-Thiosulfat-Lösung mit einer Rate von 3 ml/h vorgenommen. Die Fermentationszeit betrug 48 Stunden.

25 Die Produktion von L-Cystein wurde colorimetrisch mit dem Test von Gaitonde (Gaitonde, M. K. (1967), Biochem. J. 104, 627-633) verfolgt. Dabei ist zu berücksichtigen, daß der Test nicht zwischen L-Cystein und dem in EP 0885962 A1 beschriebenen Kondensationsprodukt von L-Cystein und Pyruvat (2-Methylthiazolidin-2,4-dicarbonsäure) diskriminiert. LL-Cystin, das 30 durch Oxidation aus L-Cystein entsteht, wird im Test durch Re-

duktion mit Dithiothreitol (DTT) in verdünnter Lösung bei pH 8,0 ebenfalls als L-Cystein nachgewiesen.

5 Tabelle 3:

Stamm	Aminosäure-Gehalt [g/l]
	L-Cystein + Derivate
W3110/pACYC184-cysEX	4,6
W3110/pG13 (cysEX-yfiK)	7,5

SEQUENZ PROTOKOLL

<110> Consortium fuer elektrochemische Industrie GmbH

5 <120> Verfahren zur fermentativen Herstellung von
Aminosaeuren und Aminosaeure-Derivaten der
Phosphoglycerat-Familie

<130> yfiK

10

<140>

<141>

<160> 4

15

<170> PatentIn Ver. 2.0

<210> 1

<211> 750

20 <212> DNA

<213> Escherichia coli

<220>

<221> CDS

25 <222> (110)..(694)

<400> 1

gatccataac cccaaaccta tcgaaaatat cgaatctaga atataaaaac attcattttt 60

30 ttaaatgttc cgtgtcggtt actgtctacc aaaacagagg agataacaa gtg aca ccg 118
Val Thr Pro

1

acc ctt tta agt gct ttt tgg act tac acc ctg att acc gct atg acg 166

35 Thr Leu Leu Ser Ala Phe Trp Thr Tyr Thr Leu Ile Thr Ala Met Thr

5

10

15

cca gga ccg aac aat att ctc gcc ctt agc tct gct acg tcg cat gga 214

Pro	Gly	Pro	Asn	Asn	Ile	Leu	Ala	Leu	Ser	Ser	Ala	Thr	Ser	His	Gly	
20					25				30				35			
ttt cgt caa agt acc cgc gtg ctg gca ggg atg agt ctg gga ttt ttg															262	
5	Phe	Arg	Gln	Ser	Thr	Arg	Val	Leu	Ala	Gly	Met	Ser	Leu	Gly	Phe	Leu
					40				45				50			
att gtg atg tta ctg tgt gcg ggc att tca ttt tca ctg gca gtg att															310	
	Ile	Val	Met	Leu	Leu	Cys	Ala	Gly	Ile	Ser	Phe	Ser	Leu	Ala	Val	Ile
10					55				60				65			
gac ccg gca gcg gta cac ctt ttg agt tgg gcg ggg gcg gca tat att															358	
	Asp	Pro	Ala	Ala	Val	His	Leu	Leu	Ser	Trp	Ala	Gly	Ala	Ala	Tyr	Ile
					70			75				80				
15																
gtc tgg ctg gcg tgg aaa atc gcc acc agc cca aca aag gaa gac gga															406	
	Val	Trp	Leu	Ala	Trp	Lys	Ile	Ala	Thr	Ser	Pro	Thr	Lys	Glu	Asp	Gly
					85			90				95				
20																
ctt cag gca aaa cca atc agc ttt tgg gcc agc ttt gct ttg cag ttt															454	
	Leu	Gln	Ala	Lys	Pro	Ile	Ser	Phe	Trp	Ala	Ser	Phe	Ala	Gln	Phe	
					100			105			110		115			
gtg aac gtc aaa atc att ttg tac ggt gtt acg gca ctg tcg acg ttt															502	
	Val	Asn	Val	Lys	Ile	Ile	Leu	Tyr	Gly	Val	Thr	Ala	Leu	Ser	Thr	Phe
					120			125			130					
30																
gtt ctg ccg caa aca cag gcg tta agc tgg gta gtt ggc gtc agc gtt															550	
	Val	Leu	Pro	Gln	Thr	Gln	Ala	Leu	Ser	Trp	Val	Val	Gly	Val	Ser	Val
					135			140			145					
35																
ttg ctg gcg atg att ggg acg ttt ggc aat gtg tgc tgg gcg ctg gcg															598	
	Leu	Leu	Ala	Met	Ile	Gly	Thr	Phe	Gly	Asn	Val	Cys	Trp	Ala	Leu	Ala
					150			155			160					
ggg cat ctg ttt cag cga ttg ttt cgc cag tat ggt cgc cag tta aat															646	
	Gly	His	Leu	Phe	Gln	Arg	Leu	Phe	Arg	Gln	Tyr	Gly	Arg	Gln	Leu	Asn
					165			170			175					

atc gtg ctt gcc ctg ttg ctg gtc tat tgc gcg gta cgc att ttc tat 694
Ile Val Leu Ala Leu Leu Val Tyr Cys Ala Val Arg Ile Phe Tyr
180 185 190 195
5 taacgaaaaa aagcggaaga ggtcgccctc ttccgcttag taacttgctta cttaag 750

<210> 2
10 <211> 195
<212> PRT
<213> Escherichia coli

<400> 2
15 Val Thr Pro Thr Leu Leu Ser Ala Phe Trp Thr Tyr Thr Leu Ile Thr
1 5 10 15

Ala Met Thr Pro Gly Pro Asn Asn Ile Leu Ala Leu Ser Ser Ala Thr
20 25 30
20 Ser His Gly Phe Arg Gln Ser Thr Arg Val Leu Ala Gly Met Ser Leu
35 40 45

Gly Phe Leu Ile Val Met Leu Leu Cys Ala Gly Ile Ser Phe Ser Leu
50 55 60

Ala Val Ile Asp Pro Ala Ala Val His Leu Leu Ser Trp Ala Gly Ala
65 70 75 80

30 Ala Tyr Ile Val Trp Leu Ala Trp Lys Ile Ala Thr Ser Pro Thr Lys
85 90 95

Glu Asp Gly Leu Gln Ala Lys Pro Ile Ser Phe Trp Ala Ser Phe Ala
100 105 110

35 Leu Gln Phe Val Asn Val Lys Ile Ile Leu Tyr Gly Val Thr Ala Leu
115 120 125

Ser Thr Phe Val Leu Pro Gln Thr Gln Ala Leu Ser Trp Val Val Gly
130 135 140

5 Val Ser Val Leu Leu Ala Met Ile Gly Thr Phe Gly Asn Val Cys Trp
145 150 155 160

Ala Leu Ala Gly His Leu Phe Gln Arg Leu Phe Arg Gln Tyr Gly Arg
165 170 175

10 Gln Leu Asn Ile Val Leu Ala Leu Leu Leu Val Tyr Cys Ala Val Arg
180 185 190

Ile Phe Tyr
195

15

<210> 3
<211> 35
<212> DNA
20 <213> Artificial Sequence

<220>
<223> Primer for PCR

<400> 3
ggaattcatt aatgatccat aaccccaaac ctatc 35

30 <210> 4
<211> 33
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

35 <220>
<223> Primer for PCR

<400> 4
gccttaatta agtagcaagt tactaagcgg aag 33

Patentansprüche

1. Mikroorganismenstamm, der zur fermentativen Herstellung von Aminosäuren der Phosphoglycerat-Familie oder deren Derivate geeignet ist, herstellbar aus einem Ausgangsstamm, dadurch gekennzeichnet, dass er eine gegenüber dem Ausgangsstamm erhöhte Aktivität eines yfiK-Genprodukts oder eines Genprodukts eines yfiK-Homologs aufweist.
- 10 2. Mikroorganismenstamm gemäß Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, dass es sich um einen Pilz, eine Hefe oder ein Bakterium, vorzugsweise aus der Familie Enterobacteriaceae, insbesondere bevorzugt der Art *Escherichia coli*, handelt.
- 15 3. Mikroorganismenstamm gemäß Anspruch 1 oder 2, dadurch gekennzeichnet, dass die Kopienzahl des yfiK-Gens in dem Mikroorganismus erhöht ist oder die Expression des yfiK-Gens durch Einsatz geeigneter Promotoren oder Translationssignale gesteigert wurde.
- 20 4. Mikroorganismenstamm gemäß Anspruch 3, dadurch gekennzeichnet, dass der Promotor ausgewählt ist aus der Gruppe konstitutiver GAPDH-Promotor des gapA-Gens, induzierbarer lac-, tac-, trc-, lambda-, ara und tet-Promotor.
- 25 5. Mikroorganismenstamm gemäß einem der Ansprüche 1 bis 4, dadurch gekennzeichnet, dass es sich um einen *Escherichia coli* Stamm handelt, bei dem die erhöhte Aktivität eines yfiK-Genprodukts auf der Erhöhung der Kopienzahl des yfiK-Gens in einem pACYC-Derivat beruht.
- 30 6. Plasmid, dadurch gekennzeichnet, dass es ein yfiK-Gen mit einem Promotor enthält.
- 35 7. Plasmid gemäß Anspruch 6, dadurch gekennzeichnet, dass zusätzlich ein genetisches Element zur Deregelierung des Cysteinstoffwechsels enthält.

8. Verfahren zur Herstellung eines Mikroorganismenstamms gemäß einem der Ansprüche 1 bis 5, dadurch gekennzeichnet, dass in einen Ausgangsstamm ein Plasmid gemäß Anspruch 6 oder 7 eingebracht wird.

5

9. Verfahren zur Herstellung einer Aminosäure der Phosphoglycerat-Familie, dadurch gekennzeichnet, dass ein Mikroorganismenstamm gemäß einem der Ansprüche 1 bis 5 in einer Fermentation eingesetzt und die produzierte Aminosäure aus dem 10 Fermentationsansatz abgetrennt wird.

10. Verfahren gemäß Anspruch 9, dadurch gekennzeichnet, dass der Mikroorganismenstamm in einem Fermenter als kontinuierliche Kultur, als batch-Kultur oder vorzugsweise als fed-batch-Kultur angezogen wird.

11. Verfahren nach Anspruch 9 oder 10, dadurch gekennzeichnet, dass eine C-Quelle während der Fermentation kontinuierlich zudosiert wird.

20

12. Verfahren einem der Ansprüche 9 bis 11, dadurch gekennzeichnet, dass als C-Quelle Zucker, Zuckeralkohole oder organische Säuren dienen.

13. Verfahren nach einem der Ansprüche 9 bis 12, dadurch gekennzeichnet, dass die Dosierung der C-Quelle in einer Form erfolgt, die gewährleistet, dass der Gehalt an C-Quelle im Fermenter während der Fermentation in einem Bereich von 0,1 - 50 g/l, besonders bevorzugt ist ein Bereich von 0,5 - 10 30 g/l gehalten wird.

14. Verfahren nach einem der Ansprüche 9 bis 13, dadurch gekennzeichnet, dass als N-Quelle Ammoniak, Ammoniumsalze oder Proteinhydrolysate verwendet werden.

35

15. Verfahren nach einem der Ansprüche 9 bis 14, dadurch gekennzeichnet, dass die Fermentation unter aeroben Wachstumsbedingungen erfolgt.

Zusammenfassung

Verfahren zur fermentativen Herstellung von Aminosäuren und Aminosäure-Derivaten der Phosphoglycerat-Familie

5

Mikroorganismenstamm, der zur fermentativen Herstellung von Aminosäuren der Phosphoglycerat-Familie oder deren Derivaten geeignet ist, herstellbar aus einem Ausgangsstamm, dadurch gekennzeichnet, dass er eine gegenüber dem Ausgangsstamm erhöhte 10 Aktivität eines yfiK-Genprodukts oder eines Genprodukts eines yfiK-Homologs aufweist.

Fig. 1: Plasmidkarte von pG13

